

## 【総説】

## マウス精巢の形態学

## Morphology of the mouse testis

金沢大学医薬保健研究域医学系組織細胞学  
(解剖学第一)

仲 田 浩 規

## はじめに

妊娠を望むカップルの15%が不妊であり、その原因の半数は男性側にあるとされている<sup>1)</sup>。原因の多くは精子形成障害であるが、機序が解明されたものは少なく、現在多くの研究室が遺伝子改変マウスを用いた精巢の研究を行っている。研究の基盤として、精巢内の大部分を占める精細管の三次元構造を含む詳細な形態を明らかにすることと、精子形成能を判断するための正確な造精細胞を同定する技術の確立が不可欠である。本稿では、マウス精巢全体像から精細管の三次元構造および精細管断面の組織像について概説する。

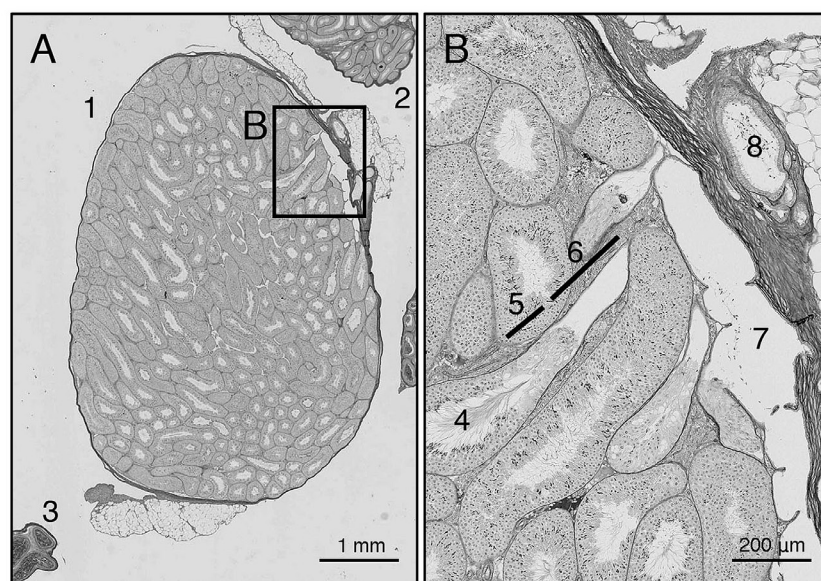
## 精巢の全体像

マウス (C57BL/6) 成体の精巢は重量が約100 mg、サイズが約8 x 5 mm の楕円体である。精巢は緻密結合組織の白膜で覆われ、精巢断面の大部分は精細管で占められている (図1A, B)。精細管と精細管の間には血管、リンパ管、マクロファージ、ライデッヒ細胞が存在する。マクロファージは未分化精祖細胞が局在する精細管の周

りに多く、1つの役割として、精祖細胞の分化を制御していると考えられている<sup>2)</sup>。ライデッヒ細胞は血管の周りに小さな集団を作って存在するとされ、下垂体ホルモンである黄体形成ホルモンの刺激によりアンドロゲンを分泌する。精細管は3つの構造に分けることができる<sup>3)</sup>。精子形成が行われる精細管は曲精細管と呼ばれ、セルトリ細胞と造精細胞の2種類の細胞が存在する。曲精細管で作られた精子は精巢網に運ばれるが、両者の間には2つの異なる構造からなる漏斗型の精細管がある。曲精細管に続く円錐の構造は中間部 *intermediate region* と呼ばれ、その上皮は背の高いセルトリ細胞のみからなる。中間部と精巢網をつなぐ比較的まっすぐな構造は直精細管と呼ばれ、精巢網の上皮と類似し、背の低い立方上皮から構成されている。作られた精子は精巢網から精巢輸尿管を介し、精巢上体に運ばれる。

## 精細管の三次元構造

精細管は胎生期では精巢索 *testis cord* と呼ばれる。マウス精巢索は胎生12.5日から実体顕微鏡下で観察可能となる。20世紀初めにマウスの精巢索の三次元構造が報



1. 精巢
2. 精巢上体頭部
3. 精巢上体尾部
4. 曲精細管
5. 中間部
6. 直精細管
7. 精巢網
8. 精巢輸尿管

図1. マウス成体精巢の全体像。

告された<sup>4)</sup>。精巣索は連続するC字型のアーチが気管軟骨のリングのように並び、これらのアーチの平面は精巣の長軸に直角であった(図2)。白膜直下を走行する精巣索は「outer」アーチと呼ばれ、他の精巣索は精巣の中央を埋めるように走行し、「inner」アーチと呼ばれた。同時期、マウス以外にも多くの哺乳類の精巣索の三次元構造が報告されたが、成体の精細管の三次元構造の報告は少なかった。1918年にCurtisが成体マウス精巣の連続切片を使って、完全な精細管を2本再構築することに成功し、精細管は高度に蛇行、精巣の長軸に対して直角な円軌道を描いていると報告した<sup>5)</sup>。再構築した1本は両端が精巣網に連結する単純な管で、もう1本は分岐があり、3カ所が精巣網に連結しているという構造であった。1961年、Clermontらが連続切片を使う方法で成体ラットの精細管の三次元再構築を行い、1つの精巣において、30本以上あると推定される精細管のうち20本の再構築に成功した<sup>6)</sup>。20本のうち、16本は分岐がなく、精巣網に2カ所連結する単純な管で、3本は分岐がそれぞれ1カ所あり、精巣網に3カ所連結する管、1本は盲端が存在し、精巣網に1カ所だけ連結する管であった。また、20本の精細管は大きく2つのグループに分けられ、一方は中空の漏斗型で、精細管の頭部側のターンが白膜に接近または接触し、尾部側のターンは白膜から離れ、「outer」の精細管と表現された。他方は中実の円錐型で、頭部側のターンは白膜から離れており、尾部側のターンは精巣中央に集まり、「inner」の精細管と表現された。それ以降、精細管の三次元構造に関する報告はなかった。近年、2つのグループが蛍光ラベルと共焦点レーザー顕微鏡を用いて、胎生期のマウス精巣索を高解像度で三次元再構築することに成功した<sup>7,8)</sup>が、グループ分けや本数に相違があった。Nel-Themaatら<sup>8)</sup>は、精巣索に「outer」や「inner」といったグループは存在せず、精巣索は胎生12.5日に $12.5 \pm 3.6$ 本存在し、胎生14.5日には $10.4 \pm 2.1$ 本にまで減少すると報告した。また、Combesら<sup>7)</sup>は、グループは存在し、胎生12.5日ではほとんど「outer」であるが、胎生14.5日になると「outer」が減り、半分近くが「inner」になるが、総数は変わらず、胎生14.5日で $16.8 \pm 1.7$ 本と報告した。この

相違は説明できない。胎生期の解析は可能となったが、生後の大きな精巣を共焦点レーザー顕微鏡で三次元再構築することは技術的に難しく、精細管の本数、長さ、分岐、三次元走行を含め、その詳細は不明であった。2015年、当研究室で生後70日齢のマウス精巣の $10 \mu\text{m}$ 連続切片を作製し、HE染色を行い、バーチャルスライドスキャナでデジタル化した。三次元再構築ソフトAmiraを用いてすべての画像の軸合わせを行い、直精細管に続く中間部と曲精細管の輪郭を手動でトレース、前後のスライドで同じ精細管をトレースしていき、別の精巣網につながるまで繰り返すことで、精巣にある全ての精細管を高解像度で再構築することに成功した<sup>9)</sup>。

精細管は1つの精巣に11本存在し、「outer」や「inner」といったグループは存在しなかった。精細管1本の長さは $140 \text{ mm}$ 、精巣全体で分岐が9箇所、盲端は1箇所であった。分岐がなく精巣網に2カ所連結する単純な管が5本、分岐が1カ所だけ存在する管が2本、分岐が2カ所以上存在する管が3本、盲端があり精巣網と1カ所だけ連結する管が1本であった。どの精細管も上下にヘアピンカーブを描きながらぐりと円周状の走行を示し、頭部に近いカーブは精巣の表面、尾部に近いカーブは内側、全体として漏斗型を示した(図2, 3)。尾部側が、頭部側の精細管を外側下部からコップを重ねるように取り巻いているので、外側から精巣を観察すると精巣網の上端につながる精細管から順に規則正しい層構造を示し、横断面では同心円状を示した(図3)。2015年は1つの精巣の三次元再構築のみの報告であったが、現在、10匹のマウス精巣の三次元再構築に成功している。精細管は1つの精巣に平均11.9本(最小9本、最大16本)、分岐は平均15.0カ所(最小9カ所、最大20カ所)、「outer」や「inner」といったグループは存在しなかった。再構築した精細管119本のうち、分岐がなく精巣網に2カ所連結する単純な管が41本(34%)、分岐が1カ所だけ存在する管が47本(39%)、分岐が2カ所以上存在する管が29本(24%)、盲端が存在する管が2本(2%)であった。個体差はあるものの、出生後も胎生期の基本的な規則性を保っていることが明らかとなった。

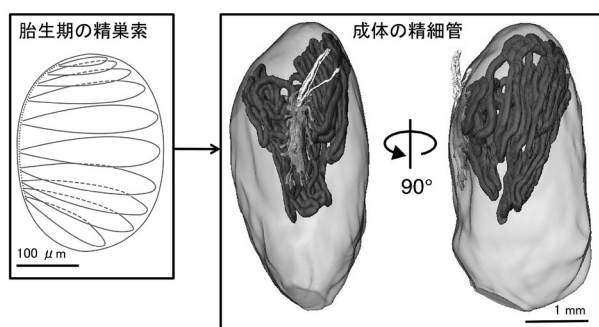


図2. 胎生13日齢精巣索の模式図と成体精細管1本の三次元走行。

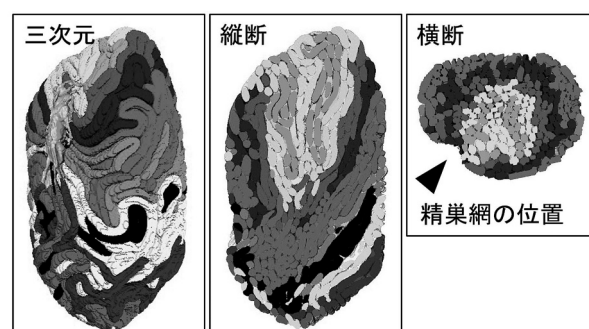


図3. 全ての精細管の三次元再構築およびその縦断と横断。



# 精細管上皮のステージ決定・細胞同定方法および造精細胞数の定量

精細管で精子形成 *Spermatogenesis* が行われる。精子形成とは未分化精祖細胞が成熟した精子になる過程であるが、4つのステップ、つまり、精祖細胞 *Spermatogonia* の有糸分裂、精母細胞 *Spermatocyte* の減数分裂、精子細胞 *Spermatid* の形態変化 (精子完成 *Spermiogenesis*)、排精 *Spermiation* から成る。分化していく造精細胞は基底側から内腔に向かって移動すること、および未分化精祖細胞の集団が一定の間隔で分化過程に入ることから、どの精細管の断面においても、4世代または5世代の造精細胞を観察することができる。この造精細胞の組合せはステージと呼ばれ、12のステージに分けられる<sup>10)11)</sup>。組

織をBouin's 液で浸漬固定し、パラフィン包埋、PAS-Hematoxylin (PAS-H) 染色を用いて、精子細胞の先体を赤く染めることで、正確なステージ決定が可能である。Bouin's 液はピクリン酸、ホルマリン、酢酸を混合した固定液であるため浸透力が強く、構造の保持に向いており、特に核の構造が美しく保持される。一方、強力な蛋白質の架橋が起こるため、抗原と抗体に依存するが、免疫組織化学法には最適ではない。免疫組織化学法では4%パラホルムアルデヒド (4%PFA) 固定液、パラフィン包埋が汎用されているが、Bouin's 液固定と比較し、PAS-H染色において先体の判別が困難で、核のクロマチン構造も不明瞭なことが多いために、一部の研究報告において、正確性に欠くステージ決定および細胞同定がなされている

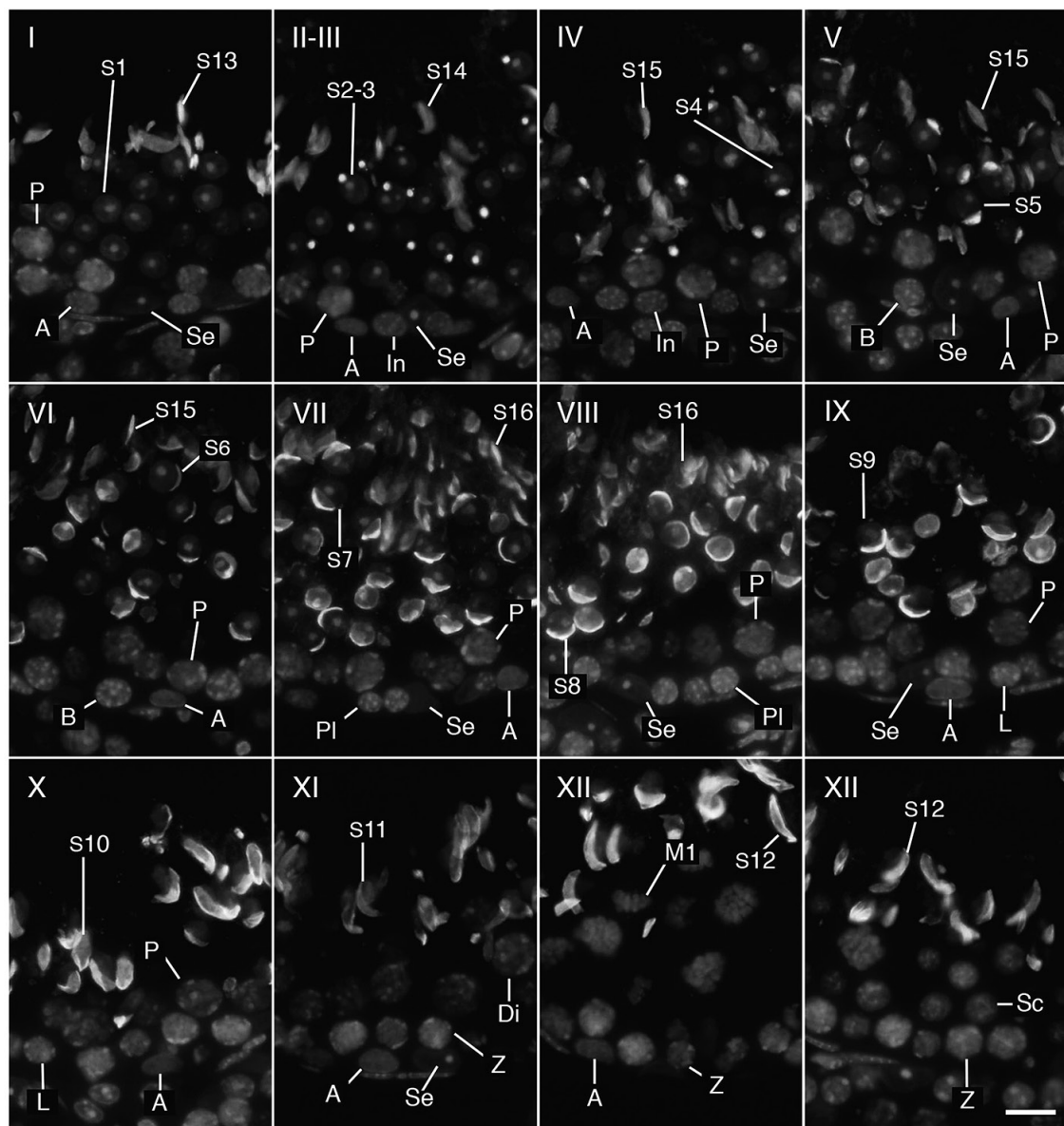


図4. 精細管におけるPNAレクチン組織化学と核染色 (DAPI) を用いた精子形成のステージ (I-XII) 決定と細胞同定。

Se, セルトリ細胞; A, A型精祖細胞; In, 中間型精祖細胞; B, B型精祖細胞; Pl, プレプレトテン期精母細胞; L, レプトテン期精母細胞; Z, ザイゴテン期精母細胞; P, パキテン期精母細胞; Di, ディプロテン期精母細胞; M1, 第一減数分裂中の精母細胞; Sc, 二次精母細胞; S1-16, step 1-16 の精子細胞。バー = 10  $\mu$ m

Stage	精祖細胞		精母細胞		精子細胞	
	A	In-B	Pl-L-Z	P-Di-M	Step 1-12	Step 13-16
I	7.9 ± 2.6			51.5 ± 7.7	153.0 ± 31.3	125.5 ± 23.2
II-III	1.6 ± 1.4	10.8 ± 3.9		53.4 ± 8.5	149.8 ± 26.8	110.3 ± 27.3
IV	1.8 ± 1.7	13.4 ± 3.9		51.2 ± 8.4	147.6 ± 28.0	97.6 ± 25.6
V	2.5 ± 2.5	24.6 ± 3.9		47.1 ± 9.0	148.7 ± 24.7	98.8 ± 30.2
VI	2.4 ± 1.7	28.1 ± 7.9		50.8 ± 7.8	146.8 ± 26.7	110.8 ± 30.6
VII	2.4 ± 1.9		47.6 ± 7.8	51.2 ± 7.1	142.9 ± 28.2	112.2 ± 24.7
VIII	1.8 ± 1.5		49.7 ± 8.0	50.4 ± 9.9	145.5 ± 23.4	95.4 ± 17.2
IX	3.6 ± 2.4		51.3 ± 7.9	55.7 ± 7.2	138.5 ± 35.5	
X	4.0 ± 1.9		51.9 ± 8.4	57.5 ± 12.9	138.6 ± 43.1	
XI	4.5 ± 1.9		53.3 ± 6.2	61.3 ± 10.4	142.7 ± 20.4	
XII	5.8 ± 2.6		51.4 ± 7.1	96.3 ± 31.3	144.6 ± 30.4	

表1. 各ステージの精細管における各段階の造精細胞数の定量。精細管の正円断面1個あたりの平均細胞数を示す。

A, A型精祖細胞; In, 中間型精祖細胞; B, B型精祖細胞; Pl, プレレプトテン期精母細胞; L, レプトテン期精母細胞; Z, ザイゴテン期精母細胞; P, パキテン期精母細胞; Di, ディプロテン期精母細胞; M, 分裂中の精母細胞; S1-16, step 1-16の精子細胞。

現状がある。そこで、当教室が発表したPNAレクチンを用いた4%PFA使用時のステージ決定・細胞同定方法および定量解析、その応用を紹介する(図4, 表1)<sup>12)</sup>。

加水分解による組織構造の破壊や細胞内物質の拡散を最小限にするために、固定は4℃で行われることが多い。しかしながら、固定液の組織内浸透と架橋反応速度が遅くなるため、微細構造を保持するためには、室温での数時間の固定が望ましい。当教室では4%PFA固定液を使い、灌流固定後、室温で浸漬固定を4時間から一晩行う。パラフィン切片は熱処理をすることで抗原を賦活化するのみならず、レクチンの反応性を上げる効果もある。熱処理は20mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 9.0) 中で行うと、抗原にも依存するが、賦活化の効果が極めて高い<sup>13)</sup>。当教室では上記緩衝液中で95℃ 15分間のオートクレーブを行い、引き続き通常のレクチン組織化学・免疫組織化学を行う。先体マーカーであるPNAレクチンと核染色を用いることで、ステージ決定と細胞同定を行うことが可能となる(図4)が、十分な訓練が必要である。先体の形態を用いたステージ決定については優れた成書があるので参照されたい<sup>14)</sup>。細胞マーカー抗体による免疫染色を併用することで、ステージ決定の訓練の負荷を減らすことができる。特に、セルトリ細胞マーカーであるGATA-4, A型精祖細胞マーカーであるZBTB 16 (PLZF), 精母細胞マーカーであるSCP3が有用である。上記の細胞マーカー抗体とAlexa488標識PNAレクチン、核染色 (DAPI) を用いて、各ステージの造精細胞数を定量した(表1)。4%PFA固定液・3 μm切片・1つの正円の精細管断面の定量である。精細管の断面1つあたりセルトリ細胞数は

18.1 ± 3.4個であった。これはステージによって変化しない。A型精祖細胞はステージIIからVIIIの間で最も少なく、ステージIXからXIIまで次第に増加し、ステージIで最大となった。中間型精祖細胞はステージIIからIVにのみ存在し、精細管の断面1つあたり11.8 ± 4.1個であった。B型精祖細胞はステージVとVIにのみ存在し、精細管の断面1つあたり26.1 ± 6.3個であった。ステージVIIとVIIIのプレレプトテン期精母細胞、ステージIXとXのレプトテン期精母細胞、ステージXIとXIIのザイゴテン期精母細胞、ステージIからXのパキテン期精母細胞、ステージXIのディプロテン期精母細胞の数に有意差はなく、51.4 ± 8.7であった。分裂中の精母細胞はステージXIIに限定され、96.3 ± 31.3であった。Step 1から12の精子細胞の数に有意差はなく、144.6 ± 29.8であった。Step 13から16の精子細胞数はステージにより大きく異なっていた。精子細胞は核の直径が小さいために切片に含まれる確率が低くなる。切片の厚さと核の直径を考慮し、中間型精祖細胞、B型精祖細胞、一次精母細胞および精子細胞の数の相対値を計算すると、1:2:4:16であるという理論上の値とほぼ一致した。しばしば言われるような造精細胞の大量のアポトーシスというのは、未熟な精祖細胞の段階では起こりうるとしても減数分裂の過程ではほとんど起こらないことが示唆された。このようにして、正常なマウス精巣における各ステージの造精細胞数の基準を決定することができた。

現在、多くの雄性不妊モデルマウスが遺伝子改変により作製されている。精細管の組織像は造精細胞が全く見られずセルトリ細胞のみが存在するものから、ほとんど

正常と変わらないものまで千差万別である。細胞接着分子Nectin-2やNectin-3の欠損マウスは雄性不妊であるが、後期精子細胞の核の形態異常と細胞配列に若干の乱れがあるのみで、精子形成は最終ステップまで進んでいるかのような組織像を呈し、どの細胞から異常があるのか組織像からは判断がつかなかった。そこで、前述の基準値を使うことで、Nectin-2とNectin-3欠損マウスにおいて、それぞれステージVIIのStep 16, ステージXIのStep 11以降の精子細胞数が有意に減少していることが初めて明らかとなった<sup>12)</sup>。

## おわりに

マウス精巣の形態の詳細を明らかにすることは精巣研究の基盤となり、多くのデータを定量的に扱うことを可能にする。当教室の研究により、精細管の本数、長さも含めその三次元構造が明らかとなった。また、精細管の断面における造精細胞数の正確な基準を作成したことで、どの段階の細胞数が異常であるのかに基づく精子形成能の定量解析が可能となった。今後はマクロの三次元構造にミクロの精子形成能の情報を加えた形態学的研究を進めるとともに、正常および病的なヒト精巣の形態や精子形成能の詳細も明らかにし、診断・治療を見据えた正確な定量解析を可能にしていきたい。

## 謝辞

本総説の執筆にあたり、研究のご指導を賜りました金沢大学医薬保健研究域医学系組織細胞学（旧講座名：解剖学第一）の井関尚一教授ならびに熊本大学大学院生命科学研究部生体微細構築学分野の若山友彦教授に深謝いたします。また、執筆の機会を与えてくださいました金沢大学十全医学会誌編集委員会の皆様に厚く御礼申し上げます。

## 文献

- 1) Fisher JR, Hammarberg K. Psychological and social aspects of infertility in men: an overview of the evidence and implications for psychologically informed clinical care and future research. *Asian J Androl* 14: 121-9, 2012
- 2) DeFalco T, Potter SJ, Williams AV, Waller B, Kan MJ, Capel

B. Macrophages contribute to the spermatogonial niche in the adult testis. *Cell Rep* 12: 1107-1119, 2015

3) Perey B, Clermont Y, Leblond CP. The wave of the seminiferous epithelium in the rat. *Am J Anat* 108: 47-77, 1961

4) De Burlet HM, HJ de Ruiter. Zur Entwicklung und Morphologie des Säugerhodens. I. Der Hoden von *Mus musculus*. *Anat Heft* 59: 321-384, 1920-21

5) Curtis GM. The morphology of the mammalian seminiferous tubule. *Am J Anat* 24: 339-394, 1918

6) Clermont Y, Huckins C. Microscopic anatomy of the sex cords and seminiferous tubules in growing and adult male albino rats. *Am J Anat* 108: 79-97, 1961

7) Combes AN, Lesieur E, Harley VR, Sinclair AH, Little MH, Wilhelm D, Koopman P. Three - dimensional visualization of testis cord morphogenesis, a novel tubulogenic mechanism in development. *Dev Dyn* 238: 1033-1041, 2009

8) Nel - Themaat L, Vadakkan TJ, Wang Y, Dickinson ME, Akiyama H, Behringer R R. Morphometric analysis of testis cord formation in Sox9 - EGFP mice. *Dev Dyn* 238: 1100-1110, 2009

9) Nakata H, Wakayama T, Sonomura T, Honma S, Hatta T, Iseki S. Three - dimensional structure of seminiferous tubules in the adult mouse. *J Anat* 227: 686-694, 2015

10) Oakberg EF. A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Am J Anat* 99: 391-413, 1956

11) Meistrich ML, Hess RA. Assessment of spermatogenesis through staging of seminiferous tubules. *Methods Mol Biol* 927: 299-307, 2013

12) Nakata H, Wakayama T, Takai Y, Iseki S. Quantitative analysis of the cellular composition in seminiferous tubules in normal and genetically modified infertile mice. *J Histochem Cytochem* 63: 99-113, 2015

13) Yamashita S. Heat-induced antigen retrieval: mechanisms and application to histochemistry. *Prog Histochem Cytochem* 41: 141-200, 2007

14) Russell LD, Ettlin RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED. Histological and histopathological evaluation of the testis. Cache River Press, 1990